

REC'D 22 MAR 2004

WIPO PCT



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

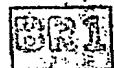
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

INPI
N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

69 540 VI, 2002

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 27 DEC 2002

LIEU 75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT 0216785

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE
PAR L'INPI 27 DEC. 2002

Vos références pour ce dossier
(facultatif) 240277 D20881 NT

■ NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
A QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU

20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

N° attribué par l'INPI à la télécopie

Cochez l'une des 4 cases suivantes

■ MATERIE DE LA DEMANDE

Demande de brevet



Demande de certificat d'utilité



Demande divisionnaire



Demande de brevet initiale



ou demande de certificat d'utilité initiale



Transformation d'une demande de
brevet européen Demande de brevet initiale



N°

Date

N°

Date

N°

Date

■ TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Poudres de phosphates de calcium biocompatibles pour des matériaux implantables

■ DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date N°

Pays ou organisation

Date N°

Pays ou organisation

Date N°

S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

■ DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

Personne morale Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

FRAYSSINET, Patrick

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile

Rue

ou

Code postal et ville

siège

Pays

Nationalité

FRANCE

N° de téléphone (facultatif)

Française

Adresse électronique (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

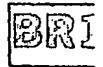
**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354-0:

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

Réserve à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES DATE	16. NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE
LIEU	Cabinet REGIMBEAU
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	FRANCE
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240253 D20847 NT	

Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes
Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire	<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i>	N°	Date
<i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>	N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen	<input type="checkbox"/>	Date
<i>Demande de brevet initiale</i>	N°	

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PARTICULES ET CÉRAMIQUES DE PHOSPHATES DE CALCIUM POUR TRANSFECTION IN VIVO ET IN VITRO

DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		
Demandeur (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		FRAYSSINET, Patrick
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	Le Gaillard, Route de St-Thomas,
	Code postal et ville	31470 SAINT LYS
Pays		FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)
Adresse électronique (facultatif)		
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		

S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

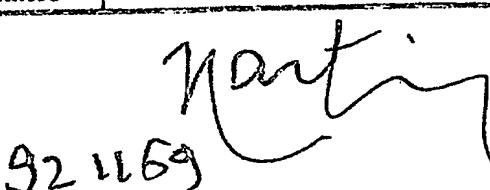
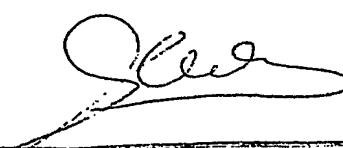
BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 2/2



REMISE DES PIÈCES	Réervé à l'INPI
DATE	27 DEC 2002
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0216785
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	DB 540 21/10/2002

10 MANDATAIRE		240277 + E19710 NT
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75647 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
11 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques.		
<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
12 RAPPORT DE RECHERCHE		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Établissement immédiat ou établissement différé		
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt		
13 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> Unique pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG		
14 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS <input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes 1		
15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		 92 1169
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

Réservé à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES	
DATE	
LIEU	
N° D'ENREGISTREMENT	0216785
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	27-12-2002

DR 540 W / 21050

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom _____ Prénom _____ Cabinet ou Société _____ N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	240253 NT 20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif) 01 44 29 35 00 N° de télécopie (facultatif) 01 44 29 35 99 Adresse électronique (facultatif) info@regimbeau.fr		
7 INVENTEUR (S)		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance <small>(rendez-vous renseigné)</small> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence). AG _____		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe <input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes <input type="checkbox"/> 1		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
<i>AM783</i>		
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI		



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

1 bis, rue de Saint Pétersbourg
75000 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N°

3 3

BR/SUITE

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU **27 DEC 2002**

75 INPI-PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0216785

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08-029-W-01001

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		ROUQUET, Nicole
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	15, rue Auguste Conte, 31400 TOULOUSE
	Code postal et ville	<input type="text"/>
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
6 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	<input type="text"/>
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		<i>Nicole</i> 321163
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI <i>Signature</i>



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75200 PARIS Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 26 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 3 / 3

BR/SUITE

REPRISE DES PIÈCES		Reservé à l'INPI	
DATE			
LIEU			
N° D'INREGISTREMENT		0216785	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		27-12-2002	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire			
Vos références pour ce dossier (facultatif)		240253 NT	
4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date _____ N° _____ Pays ou organisation Date _____ N° _____ Pays ou organisation Date _____ N° _____	
5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		ROUQUET, Nicole	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	15, rue Auguste Conte, 31400 TOULOUSE	
	Code postal et ville		
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
6. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
7. SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

5 La présente invention se rapporte à une méthode de fixation d'ADN à la surface de phosphates de calcium de caractéristiques particulières. Cette méthode peut comporter une étape de maturation du matériau dans une solution saline pour améliorer la fixation d'ADN et sa disponibilité pour la transfection de cellules. L'invention porte également sur l'utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium modifiées pour la 10 transfection de cellules *in vitro* et *in vivo* et pour la culture de cellules transfectées en réseau tridimensionnel.

La transfection de gènes dans les cellules eucaryotes est une étape clef de la thérapie génique. Plusieurs méthodes sont utilisables avec des rendements variables. Elles sont 15 utilisables *in vitro* ou *in vivo*.

A des fins de thérapie géniques, les cellules peuvent être transfectées *in vitro* puis réinjectées dans l'organisme ou bien transfectées directement dans les organes ou les tissus dans lesquels elles résident (Evans, C.H., Robbins, P.D., Possible orthopaedic 20 applications of gene therapy, J Bone Joint Surg, 77-A, 7 : 1103-1114)

Les différentes méthodes utilisées pour la transfection cellulaire sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Méthode	Avantages	Inconvénients
DEAE-dextran	Simple	Expression transitoire
Phosphate de calcium	Simple	Inutilisable pour cellules en suspension
Liposomes	Simple	Relativement non prouvé
Micro-injection	Efficace	Techniquement difficile
Electroporation	Bon pour les cellules non	Pas de co-transfection

Fusion de protoplastes	adhérentes	Résultats variables
Adénovirus	Bon pour les cellules non adhérentes Forte infectivité, production incommune, infecte les cellules ne se divisant pas, grande variété de cellules hôtes	ADN intégrés comme épisome, toxique, production de protéines virales
Adénovirus associés	Non pathogènes, Expression stable, infecte les cellules ne se divisant pas, grande variété de cellules hôtes	Supporte seulement des gènes courts, difficile à produire, peu développé
Herpès simplex	Infecte les cellules ne se divisant pas, supporte des gènes longs,	Toxique, expression transitoire, peu développé
Infection par retrovirus	Efficace	Type cellulaire réduit par le tropisme, capacité de codage basse,
Solides polycationiques	Simple, transfection localisée	Expression transitoire
Chromosome satellite	Permet de transférer des gènes longs	Résultats non prouvés

Depuis une quinzaine d'années qu'ont débuté les essais cliniques de thérapie génique, les résultats ont été dans l'ensemble décevant pour plusieurs raisons :

- 5 Quels que soient les vecteurs utilisés, adénovirus, virus associé à l'adénovirus (AAV), rétrovirus ou formulation physico-chimiques, l'efficacité de transfert des gènes dans les cellules cibles a toujours été très faible (A. Kahn. Dix ans de thérapie génique: déceptions et espoirs. *Biofutur* 202:16-21, 2000). La durée d'expression des transgènes thérapeutiques est la plupart du temps brève, limitée à quelques semaines, en raison
- 10 d'une réaction immune qui provoque l'élimination préférentielle des cellules transduites, de la longévité intrinsèque de celles-ci ou de l'extinction des séquences d'ADN ou promoteurs qui dirigent l'expression des gènes insérés (Orkin, S.H., Motulsky, A.G., report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research gene therapy. www.nih.gov/news/panelrep.html).

Enfin certains vecteurs ont manifesté un effet toxique. Des accidents sont survenus lors d'utilisation de vecteurs adénoviraux injectés dans l'organisme ayant entraîné la mort de patients dans des essais de traitement par l'ornithine transcarbamylase. (Smaglik, P., Investigators ponders what went wrong after gene therapy death. The Scientist 13 [21] :1 (1999).

Ainsi, il ressort de l'analyse de tous les essais cliniques de thérapie génique que la stratégie de transfert d'un gène nécessiterait des vecteurs beaucoup plus performant, plus sûrs et capables de transfacter préférentiellement les cellules sur lesquelles un effet thérapeutique est nécessaire (Orkin, S.H., Motulsky, A.G., report and 10 recommendations of the panel to assess the NIH investment in research gene therapy. www.nih.gov/news/panelrep.html).

C'est pour cette raison que des vecteurs polymériques polycationiques ont été développés. Ces vecteurs sont des solides et peuvent adsorber de l'ADN sous 15 différentes formes, en particulier, sous forme de plasmide. Ils ont la particularité de transfacter les cellules qui arrivent à leur contact avec un rendement variable. Ils ont été utilisés *in vivo* pour transfacter des cellules des tissus conjonctifs lâches intervenant dans la cicatrisation osseuse afin d'accélérer cette dernière (S. Goldstein and J. Bonadio. *in vivo* gene transfer methods for wound healing. The Regent of the 20 University of Michigan. Anonymous. United States:(5,962,427):1-31, 1999. thérapie génique. A61K 48/00. 514/44).

Les coprécipités de phosphates de calcium et d'ADN ont été utilisés depuis de nombreuses années afin de transfacter les cellules *in vitro* (E. T. Schenborn and V. 25 Goiffon. Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells. edited by M. J. Tymms, Totowa, NJ:Humana Press Inc, 2000, p. 135-144; W. Song and D. K. Lahiri. Efficient transfection of DNA by mixing cells in suspension with calcium phosphate. *Nucleic Acid Research* 23 (17):3609-3611, 1995; Y.-W. Yang and J.-C. Yang.

Calcium phosphate as a gene carrier: electron microscopy. *Biomaterials* 18:213-217; 1997).

- 5 Ils sont obtenus en versant une solution de chlorure de calcium dans le milieu afin de le sursaturer en calcium et de précipiter un phosphate de calcium dans lequel sont incluses des molécules d'ADN. Ces particules composites sont ensuite phagocytées par les cellules qui intègrent le plasmide de différentes manières et expriment les gènes qui sont transportés.
- 10 Cependant, ces coprécipités ont un inconvénient majeur. Ils sont très difficilement utilisables *in vivo* car il est difficile d'obtenir une sursaturation en système ouvert. D'autre part, ils ne peuvent permettre des transfections localisées dans l'espace.

- 15 Les céramiques de phosphates de calcium sont des matériaux obtenus par frittage d'une barbotine contenant des particules de phosphate de calcium en suspension. Ce sont des assemblages de grains liés par des joints de grains (Frayssinet,P., Fages, J., Bonel,G., Rouquet,N., Biotechnology, material sciences and bone repair. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology (1998) 8: 17-25).
- 20 Ces matériaux présentent une biocompatibilité particulière avec le tissu osseux, ce qui les rend particulièrement utiles comme matériau de reconstruction osseuse ou bien comme vecteur de cellules ostéogéniques (P., Frayssinet, J.L. Trouillet, N. Rouquet, E. Azimus, A. Autefage (1993), Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*, 14, 6: 423-429).

- 25 Dans le cadre de l'invention, nous avons développé des poudres et des céramiques de phosphate de calcium capables de transfacter des cellules à la fois *in vivo* et *in vitro*, notamment des cellules mésenchymateuses. La composition chimique de ces céramiques peut varier car plusieurs sels de l'acide orthophosphorique peuvent rentrer dans leur composition, en particulier, le phosphate tricalcique, l'hydroxyapatite qui est

- la phase de synthèse la plus proche de la phase minérale du tissu osseux, et le phosphate octocalcique. Ces céramiques ont une autre particularité, elles ont des propriétés de surface très variables en fonction de différents paramètres tels que, parmi d'autres, le mode de synthèse de la poudre, la température de cuisson, ou la présence de divers éléments traces. Ces différents facteurs influent en particulier sur la charge de surface, le potentiel zeta et les capacités de substitution dans la maille du phosphate de calcium. Les céramiques phosphocalcique ont également la particularité de présenter des croissance épitaxiques d'apatite carbonatée à leur surface une fois implantées dans l'organisme ou immergées dans un milieu salin de composition comparable au liquide extracellulaire (M. Heughebaert, R. Z. LeGeros, M. Gineste, and A. Guilhem. Hydroxyapatite (HA) ceramics implanted in non-bone-forming sites. Physico-chemical characterization. *J Biomed Mat Res* 22:257-268, 1988). C'est à ces croissances cristallines qu'ont été attribuées les propriétés de biocompatibilité de ces matériaux.
- 10 15 Les propriétés d'adsorption des phosphates de calcium vis-à-vis des acides nucléiques ont été mises à profit en chromatographie sur colonnes d'HA pour séparer et purifier l'ADN ou certains ARN. Il est essentiel de comprendre que, à composition chimique égale, toutes les poudres d'hydroxyapatite utilisées en chromatographie n'ont pas le même pouvoir séparateur des acides nucléiques (A. Eon-Duval, Purification of plasmid 20 DNA by hydroxyapatite chromatography, Abstract of 2nd conference on hydroxyapatite. San Francisco March 2001). Les interactions entre les molécules organiques et l'hydroxyapatite dépendent des propriétés de surface de ce minéral (M.J. Gorbunoff, Protein chromatography on hydroxyapatite columns. Methods in Enzymology, vol 182, Academic Press Inc 1985 : 329-339), qui peuvent varier d'un lot 25 à l'autre.

Il a été prouvé que la distribution des chargés à la surface du solide et ses capacités d'hydratation ont une influence importante sur l'adsorption des molécules organiques à sa surface (Norde,W., Lyklema, J., (1991) Why proteins prefer interfaces. *J Biomed*

Sci Polymer Edn 2, 183-202 (1991)). De même, la force ionique, et le pH du solvant des molécules organiques doivent être pris en compte.

Si la protéine en solution et le solide ont une charge opposée, ils s'attirent. Au moins si 5 la charge de la protéine et celle de la surface du solide se compensent grossièrement. Si les charges ne se compensent pas, cela résulte en une accumulation de charges dans la région de contact causant une haut potentiel électrostatique, énergétiquement peu favorable à une adsorption. Une situation similaire est observée lorsque la surface du solide et la molécule organique sont de même signe. Néanmoins, dans de nombreux 10 cas, l'adsorption peut se faire tout de même dans certains cas grâce à l'incorporation d'ions de la solution à l'interface de la couche adsorbée qui prévient l'accumulation de charge.

L'hydrophobie a une influence sur l'adsorption car elle participe à la répartition des 15 charges en particulier dans les molécules organiques qui ont une structure tertiaire et quaternaire. L'hydrophobie d'une surface (molécule ou bien solide) peut favoriser l'adsorption.

La répartition des charges ainsi que les capacités d'hydratation des apatites sont des 20 propriétés intéressantes car elles peuvent avoir une charge de surface positive ou négative et peuvent être hydrophiles ou hydrophobes. De plus, les substitutions dans la maille pouvant être nombreuses, les groupes fonctionnels à la surface peuvent varier.

Nous avons développé des poudres de phosphates de calcium à base d'hydroxyapatite 25 capables de fixer de l'ADN sous différentes formes et de le délivrer à des cellules isolées ou dans l'organisme à des fins de transfection. Ces poudres peuvent être injectées en suspension dans un liquide ou bien un gel. Elles peuvent également être déposées à la curette ou bien servir de vecteur transfectant à des cellules cultivées en réseau tridimensionnel. Elles ont des propriétés physico-chimiques particulières afin de

posséder ces propriétés de transfection. Une série d'expérimentation a été menée permettant de juger la transfection de cellules isolées ou non avec un plasmide porteur du gène de la galactosidase pouvant être mis en évidence par histochimie. La poudre est une mise en forme particulièrement bien adaptée pour pouvoir transfecter à la fois 5 des cellules isolées ou des tissus.

Le mécanisme intervenant dans la fixation d'ADN (molécule organique de charge négative) à la surface de particules d'hydroxyapatite peut-être :

- o Une adsorption électrostatique lorsque le matériau est de charge positive
- o Une coprécipitation des molécules d'ADN dans la couche d'apatite carbonatée apparaissant par croissance épitaxique à la surface de ces matériau et résultant de processus de dissolution/représécipitation complexes se déroulant à la surface dans des milieux sursaturés en calcium et phosphore.
- o Un échange ionique entre la phase interfaciale et la solution

15

L'ADN une fois fixé sur le matériau doit pénétrer dans la cellule. La composition et les caractéristiques de surface sont également importants pour la dégradation du matériau en milieu biologique et l'émission de particules transfectantes. On sait que les céramiques d'HA se dégradent aux joints de grains et que la couche d'apatite 20 carbonatée apparaissant à la surface du matériau par croissance épitaxique a une solubilité différente du matériau lui-même.

En revanche, tous les phosphates de calcium ne peuvent transfecter des cellules. Le DCPD par exemple ou bien certaines mises en forme d'HA ou de TCP ont montré leur 25 incapacité à le faire. Leur cytotoxicité est certainement responsable de ceci.

Au contraire, la modification de la surface des poudres et des céramiques par maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée améliore le rendement de marquage.

Description

5

Ainsi, dans un premier aspect, la présente invention se rapporte à un procédé pour modifier la surface des poudres et des céramiques de phosphates de calcium, caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant en une maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques. Cette modification de surface permet d'améliorer le rendement de transfection d'acide nucléique *in vivo* et *in vitro*.

10

Ces particules de phosphates de calcium sont immergées dans un milieu de culture du type des milieux de culture cellulaire couramment employées en biotechnologie, notamment le DMEM, pendant environ quelques minutes, par exemple 1, 5, 10 ou 30 minutes au moins à environ 12, 24, 48 heures, quelques jours ou davantage à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C. Le but est d'avoir la formation d'une couche d'apatite carbonatée à la surface avant ou pendant la mise en contact avec les plasmides.

15

20 Dans un mode de réalisation particulier, le procédé mentionné ci-dessus est réalisé avant la mise en contact avec les acides nucléiques, notamment des plasmides. Alternativement, cette étape entraînant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques est réalisée dans un milieu contenant les acides nucléiques. Dans ce mode, la modification de surface et la fixation des acides nucléiques sont réalisées simultanément.

25

De préférence, les poudres et céramiques sont immergées dans un milieu de culture DMEM pendant 48 heures à 37°C avant ou simultanément à la fixation des acides nucléiques.

Dans un aspect complémentaire, l'invention porte sur un procédé de fixation d'acide nucléique, en particulier d'ADN, à la surface de phosphates de calcium ou de céramiques de phosphates de calcium comprenant une étape a) consistant en une hydratation de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium et une étape b) consistant en une immersion des produits obtenus à l'étape a) dans une solution de tampon phosphate contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures, par exemple 1, 5, 10 ou 30 minutes au moins à environ 12, 24, 48 heures ou davantage à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.

10 Dans ce procédé, l'hydratation réside de préférence en une immersion de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium dans une solution simulant les fluides extracellulaires destinée à produire une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.

15 Les étapes a) et b) peuvent être effectuées simultanément ou successivement. Ainsi, on peut mettre en œuvre l'invention avec une solution contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures à environ 37°C.

20 Avantageusement, ce procédé permet de fixer l'ADN à pH physiologique sur des particules de phosphate de calcium. Les céramiques peuvent être des céramiques poreuses ou denses.

Dans un autre aspect, l'invention porte sur les poudres et les céramiques de phosphates de calcium susceptibles d'être obtenues à partir du procédé décrit ci-dessus, 25 caractérisées en ce qu'elles peuvent supporter une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à leur surface.

L'invention vise également les poudres et les céramiques de phosphates de calcium possédant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à leur surface et comprenant en outre les acides nucléiques fixés à leur surface.

5 Ces produits sont particulièrement efficacés pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

Avantageusement, les poudres et céramiques obtenues possèdent au moins l'une des propriétés décrites ci-après :

- 10 - Nature des groupes chargés à la surface : PO_4^- , OH^- , Ca^{++}
- pH de surface basique
- Potentiel électrocinétique négatif
- Hydrophobe
- granulométrie comprise entre 0-200 μm , en particulier entre 80-125 μm et 0-25 μm .

15

De préférence, les produits de l'invention comprennent l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus.

En outre, les poudres et céramiques de phosphates de calcium mentionnées ci-dessus 20 peuvent comporter un noyau composé d'un autre matériau polymérique, céramique ou métallique, de préférence magnétique.

L'invention vise également les particules formées à base de poudres de phosphates de calcium décrites ci-dessus, lesdites particules étant comprises dans une matrice minérale ou polymérique, en particulier dans des ciments de phosphate ou de sulfate de calcium.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à un revêtement de céramiques de prothèses articulaires ayant les caractéristiques de la céramique définie ci-dessus.

L'invention vise également l'utilisation desdites poudres et céramiques de phosphate de calcium possédant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à leur surface comme support pour la culture cellulaire, notamment pour la culture en réseau tridimensionnel de cellules transfectées par le support et pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif. Ils constituent des modes de réalisations préférés de l'invention.

Exemple 1 : Caractéristique des poudres utilisées

15

Type P15: poudre sphérique de surface spécifique $0,62 \text{ m}^2/\text{g}$. Elles ont été calcinées à 1180°C et leur granulométrie est comprise entre $80-125 \mu\text{m}$.

20

Type P1: poudre de forme quelconque de surface spécifique $56,84 \text{ m}^2/\text{g}$, non calcinée (brute) de granulométrie comprise entre $0-25 \mu\text{m}$.

L'étude granulométrique des poudres utilisées montre que les poudres sphériques (P15) ont une tranche granulométrique bien définie alors que celles de forme quelconque (P1) a des tranches granulométriques beaucoup plus larges avec beaucoup de particules fines. Le pH de charge nulle varie avec la température de calcination des poudres. Le potentiel zéta de la poudre P1 mesuré dans de l'eau déminéralisée est de $-27,5 \text{ mV}$ et le pH de surface est de 9,08.

En fonction de la température de frittage de la poudre, le pH de charge nul est variable mais largement inférieur au pH physiologique. Ceci signifie que quelque soit la

température de frittage, le potentiel électrocinétique des poudres, au pH neutre, est négatif.

5 L'examen en microscopie à balayage des poudres sphériques montre qu'elles sont constituées par des grains assemblés par des joints de grains. Il existe des irrégularités de surface sur certaines des faces des grains à fort grossissement.

Poudre	P1	P15
Nature des groupe chargés	PO_4^{2-} , OH^- , Ca^{++}	PO_4^{2-} , OH^- , Ca^{++}
Potentiel électrocinétique (mV)	-27,5	-35
Hydrophobicité	+	+
pH de surface	9,8	7,8
Granulométrie (μm)	0-25	80-125
Surface spécifique (m^2/gr)	56,84	0,62
pH de charge nul		
Forme des poudre	anguleuse	sphérique

10 Exemple 2 : Méthode de fixation de l'ADN sur le vecteur

Le vecteur peut être utilisé de deux manières différentes :

15 **Méthode A :** Il peut être incubé directement avec le plasmide dans une solution de tampon phosphate. Il est alors maintenu en contact avec celui-ci pendant plusieurs heures alors que sa surface est modifiée par croissance épitaxique d'apatite carbonatée. La fixation peut alors se faire par coprécipitation à la surface du matériau.

Méthode B : Il peut également être mis en présence d'une solution saline pendant plusieurs jours afin de modifier la surface. Une fois que celle-ci est équilibrée, le matériau est ensuite mis dans la solution contenant le plasmide. La fixation de l'ADN est supposée se faire alors à la surface de la couche épitaxique.

Fixation du plasmide sur la surface des particules natives (méthode A):

L'ADN double brin a une affinité marquée pour l'HA lorsqu'il est dissous dans des faible concentration de tampon phosphate. Ils sont élués dans des concentrations supérieures de tampon phosphate. 1 m² de surface de poudre a été disposé dans les

5 boîtes de Pétri soit 1,61 gr pour le type A et 0,017 g dans le type B.

- Hydratation de la poudre d'HA (2ml/g) dans 10ml de tampon phosphate

0,12M. Chauffage 15 à 30 mn à 100°C.

- Laisser reposer à température ambiante et sortir le tampon. Resuspendre dans 5 à 10 ml de 0,12 M de tampon phosphate à 60°C, décanter et resuspendre dans 5 ml du même tampon à 60°C.
- Ajouter l'échantillon de l'acide nucléique dans 1 ml de tampon phosphate 0,12M à 40°C (l'élution des acides nucléiques doubles brins peut se faire en lavant l'HA 8 à 10 fois avec 0,5 ml de tampon phosphate (0,4M)).

15

Fixation du plasmide à la surface des particules modifiées par croissance épitaxiques (méthode B):

20

- Les particules ont été incubées à 37°C dans du milieu de culture DMEM pendant 48 heures.
- Elles sont lavées dans une solution de tampon phosphate 0,12M
- On ajoute l'échantillon de l'acide nucléique dans 1 ml de tampon phosphate 0,12M à 40°C (l'élution des acides nucléiques doubles brins peut se faire en lavant l'HA 8 à 10 fois avec 0,5 ml de tampon phosphate (0,4M)).

25

Exemple 3 : Transfection de cellules *in vitro*

Trois lignées ont été utilisées:

- Cartilage de croissance de lapin

- Périoste de lapin
- Cellules de calvaria de rat

Elles sont obtenues en digérant la matrice collagénique dans une solution de collagénase suivie d'une centrifugation.

5

3.1 Matériau à surface non modifiée

La quantité de poudre (type B) a toujours été la même : 10 mg.

Lors de la transfection les cellules n'étaient pas à confluence. Les cellules ont été transfectées à J0 et la première évaluation par histochimie de l'expression de la galactosidase a été faite à J4, J21, J30.

A J4:

Toutes les lignées présentent des zones de marquage. Dans les trous transfectés avec des particules, les cellules marquées sont groupées autour des particules bien que certaines en soient néanmoins éloignées. Cet éloignement peut s'expliquer par le fait que les particules émettent des débris avec une surface spécifique élevée. On les voit au microscope au milieu de groupes de cellules marquées. Cellules de cartilage de croissance: en valeur absolue, c'est la série qui a été le plus marquée.

A J21

En ce qui concerne les cellules de cartilage, le nombre de cellules transfectées est important. Les cellules des calvarias de rats sont fortement positives.

A J30

Les cellules ont une inhibition de contact relative, elles sont quasiment en trois dimensions et arrondies. La plupart des cellules des trois groupes sont positives. Le nombre de cellules positives et le taux de croissance précédent semblent indiquer que les plasmides sont transmis d'une cellule à l'autre ou bien que le relargage de particules d'ADN s'étale dans le temps, le pourcentage de cellules positives aurait été très faible dans le cas contraire. Il est également possible que les relargages de particules transfectantes soient progressifs. Les cellules marquées préférentiellement sont celles au contact des particules.

Pourcentage des cellules marquées en fonction des lignées utilisées :

Temps (jours)	calvaria	Cartilage de conjugaison	périoste
4	15	32	27
21	39	42	35
30	65	71	60

5 3.2 Matériau à surface modifiée par croissance épitaxique

Dès les premiers temps de la culture, la plupart des cellules sont marquées.

3.2.1 Transfection de part et d'autre d'une membrane hémipermeable

Les grains ont été disposés au contact des cellules soit séparés de celles-ci par une 10 membrane poreuse ($0,2\mu\text{m}$) en polycarbonate les séparant du tapis cellulaire. Le marquage cellulaire par la galactosidase est évalué par histochimie à J4.

Les cellules en contact direct avec les particules sont marquées sporadiquement. Les cellules qui ne sont pas au contact des particules (séparées par la membrane) sont également marquées. Il existe donc des particules transfectantes de taille inférieure à 15 $0,2\mu\text{m}$ passant à travers les pores de la membrane en polycarbonate.

3.2.2 Transfection de cellules en réseau tridimensionnel

Les lignées cellulaires précédemment décrites sont mises en suspension dans le milieu de culture. Le lit est disposé au fond d'une boîte de culture. La suspension sert à 20 ensemencer un lit de microbilles ($1.5-2 \cdot 10^5$ cellules/0,05 gr de billes) vectrices de plasmides portant le gène la galactosidase. Le lit est disposé au fond d'une boîte de culture. Les cellules sont cultivées 10 à 15 jours. On obtient la formation d'une couche cellulaire tridimensionnelle pontant et agglomérant les billes. Cette couche contient également une matrice collagénique abondante.

A la date d'observation les cellules forment un réseau tridimensionnel pontant les différentes particules et les assemblant. La-microscopie optique révèle que les cellules contenues dans l'amas de particules sont marquées par la galactosidase.

5

3.2.3 Transfection de cellules dans des cultures de tissu

Matériau utilisé pour le marquage: Type A: poudre sphérique de surface spécifique $0,62 \text{ m}^2/\text{g}$. Elles ont été calcinées à 1180°C et leur granulométrie est $80-125 \mu\text{m}$. La quantité de poudre est de quelques dizaines de particules par boites (P15).

10

Quelques billes ont été placées au contact des fragments osseux après avoir été incubées sans pré-immersion (méthode A).

15 Les fragments osseux proviennent de fémurs, tibias et calvaria de rats nouveaux-nés agés de 3 jours. Les pièces osseuses ont été nettoyés des tissus mous attenants. Les os longs ont été coupés en trois morceaux: 2 épiphyses et la diaphyse. Les calvarias ont été coupées en petits fragments de 2 à 3 mm de côté. Ces différents fragments ont été déposés à la surface d'un gel à 3% d'agar dans du DMEM. Le milieu de culture (DMEM+SVF) a été ensuite rajouté de façon à ce que les fragments affleurent à 20 l'interface liquide-air.

Les billes ont été maintenues en contact des tissus pendant 2 à 30 jours, date à laquelle l'activité galactosidase des cellules est mise en évidence avant de faire des coupes histologiques.

25

A 2 jours de mise en contact, des zones de marquage sporadiques sont identifiables. Le marquage se fait à distance et au contact des billes d'HA. Il a lieu également au contact de ces mêmes billes.

A 30 jours, la totalité des fragments osseux a viré au bleu macroscopiquement (figure 1).

La figure 1 représente une macrophotographie d'une culture de tissu osseux en présence de poudre transfectante pendant 30 jours. Le fragment osseux est entièrement bleu en raison de la transfection des cellules par le plasmide vecteur de la galactosidase. En microscopie optique par réflexion, il n'est pas possible de voir une zone qui ne soit pas marquée. Les billes sont engluées dans une matrice marquée par la réaction à la galactosidase.

- 10 Les coupes des différents échantillons de tissu osseux cultivés 30j montrent que les cellules osseuses (ostéoblastes, chondroblastes, cellules périchondrales, cellules périostées, ostéoclastes) sont marquées (la figure 2 est une coupe histologique du même tissu montrant que toutes les cellules ont été transfectées par la galactosidase X 30).
- 15 Les cellules des lignées hématopoïétiques ne sont pas marquées. Il faut noter que:
- Toutes les cellules osseuses sont marquées
 - Elles le sont quelle que soit la distance des cellules aux billes.

3.2.4 Transfection *in vivo*

- 20 Un groupe de 10 lapins males NZW âgés de 4 semaines est sélectionné de manière aléatoire. Ces lapins sont divisés en deux groupes : Lot A et Lot B. Un lapin de chaque groupe sert de témoin.
- La zone opératoire se situe sur la mandibule côté gauche en arrière des incisives mandibulaires. Il est à noter qu'une étude préliminaire a permis de sélectionner ce site dans lequel l'os est le plus abondant. Le type de poudre P15 a été utilisé. L'ADN a été fixé par la méthode A.

Après la pose de champs stériles et la désinfection cutanée et muqueuse une incision vestibulaire intrabuccale est réalisée a l'aide d'un bistouri. Un lambeau de pleine

- épaisseur est récliné pour accéder à la zone osseuse mandibulaire à la base des incisives. Un trépan de 3mm est utilisé pour systématiser l'effraction osseuse. Le défaut osseux réalisé est de l'ordre de 2 mm de profondeur. Le volet osseux est éliminé à l'aide de ciseau à os. Le biomatériau est aspiré à l'aide d'une seringue de 5 ml et déposé dans le défaut osseux de telle manière qu'il le remplisse. Une légère pression est utilisée avec une gaze stérile pour maintenir en place le biomatériau. Le lambeau repositionné est ensuite suturé
- Deux témoins subissent une deuxième opération controlatérale sans dépose de biomatériau.
- 10 Les lapins ont été sacrifiés à 3 et 6 semaines. Les mandibules ont été prélevées, fixées dans l'éthanol et incluse dans de l'hydroxy-ethylmethacrylate. Des coupes de 5 μm d'épaisseur ont été réalisées et l'activité galactosidase mise en évidence

• A 3 semaines :

15 *Dans les sites témoins :*

Les coupes histologiques montrent un os spongieux avec peu de trabécules dont les pores sont occupées par un tissu stromal très lâche. Il existe des cellules multinucléées d'allure ostéoclastique à la surface des trabécules. Ces cellules sont toutes marquées par la réaction à la galactosidase. De la même manière, tous les monocytes sont également marqués. Ce sont les seules cellules qui sont marquées.

20 *Dans les sites implantés :*

Les coupes passant à travers les billes de phosphate de calcium montrent que les billes sont incluses dans un tissu conjonctif relativement dense avec de nombreuses cellules multinucléées à leur surface. Toutes les cellules, fibroblastiques ou multinucléées sont marquées par la galactosidase.

25 Lorsque les coupes s'éloignent des billes, il existe moins de cellules marquées néanmoins les structures tissulaires n'ayant pas été perturbées par l'acte opératoire donnent des informations intéressantes. Les fibroblastes des ligaments dentaires sont marquées. Il existe des îlots de cellules d'aspect fibroblastique marquées dans le tissu

stromal des pores entre les trabécules. Dans certains cas, il semble même que des cellules de la lignée ostéoblastique soient également marquées.

o 6 semaines :

5 Macroscopiquement, il existe un marquage autour des grains d'HA. Les coupes montrent des cellules stromales positives.

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé pour modifier la surface des poudres et des céramiques de phosphates de calcium, caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant en une maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les particules de phosphates de calcium sont immersées dans un milieu de culture du type des milieux de culture cellulaire.
- 15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les particules de phosphates de calcium sont immersées pendant environ quelques minutes à quelques jours.
4. Procédé selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisé en ce que les particules de phosphates de calcium sont immersées à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.
- 20 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est réalisé avant la mise en contact avec les acides nucléiques.
- 25 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est réalisé simultanément à la mise en contact avec les acides nucléiques.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape entraînant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques est réalisée dans un milieu contenant les acides nucléiques.

8. Procédé de fixation d'ADN à la surface de phosphates de calcium ou de céramiques de phosphates de calcium comprenant une étape a) consistant en une hydratation de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium et une étape b) consistant en une immersion des produits obtenus à l'étape a) dans une solution de tampon phosphate contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.
- 10 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'hydratation réside en une immersion de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium dans une solution simulant les fluides extracellulaires destinée à produire une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.
- 15 10. Procédé selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que les étapes a) et b) sont effectuées simultanément ou successivement.
11. Procédé selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisé en ce qu'il permet de fixer l'ADN à pH physiologique sur des particules de phosphate de calcium.
- 20 12. Poudres et céramiques de phosphates de calcium susceptibles d'être obtenues à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisées en ce qu'elles supportent une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à leur surface.
- 25 13. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon la revendication 12 comprenant en outre les acides nucléiques fixés à leur surface.
14. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 et 13 caractérisées en ce qu'elles possèdent au moins l'une des propriétés suivantes :

- Nature des groupes chargés à la surface : PO_4^{2-} , OH^- , Ca^{2+}
 - pH de surface basique
 - Potentiel électrocinétique négatif
 - Hydrophobe
- 5 - granulométrie comprise entre 0-200 μm , en particulier entre 80-125 μm et 0-25 μm .

15. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 14 caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre un noyau composé d'un autre matériau polymérique, céramique ou métallique, de préférence magnétique.

10

16. Particules formées à base de poudres de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 15 comprises dans une matrice minérale ou polymérique en particulier dans des ciments de phosphate ou de sulfate de calcium.

15 17. Revêtement de céramiques de prothèses articulaires ayant les caractéristiques de la céramique définie selon l'une des revendications 12 à 15.

18. Utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 15 pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

20

19. Utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 12 à 15 pour la culture de cellules transféctées par le support en réseau tridimensionnel.

25

30

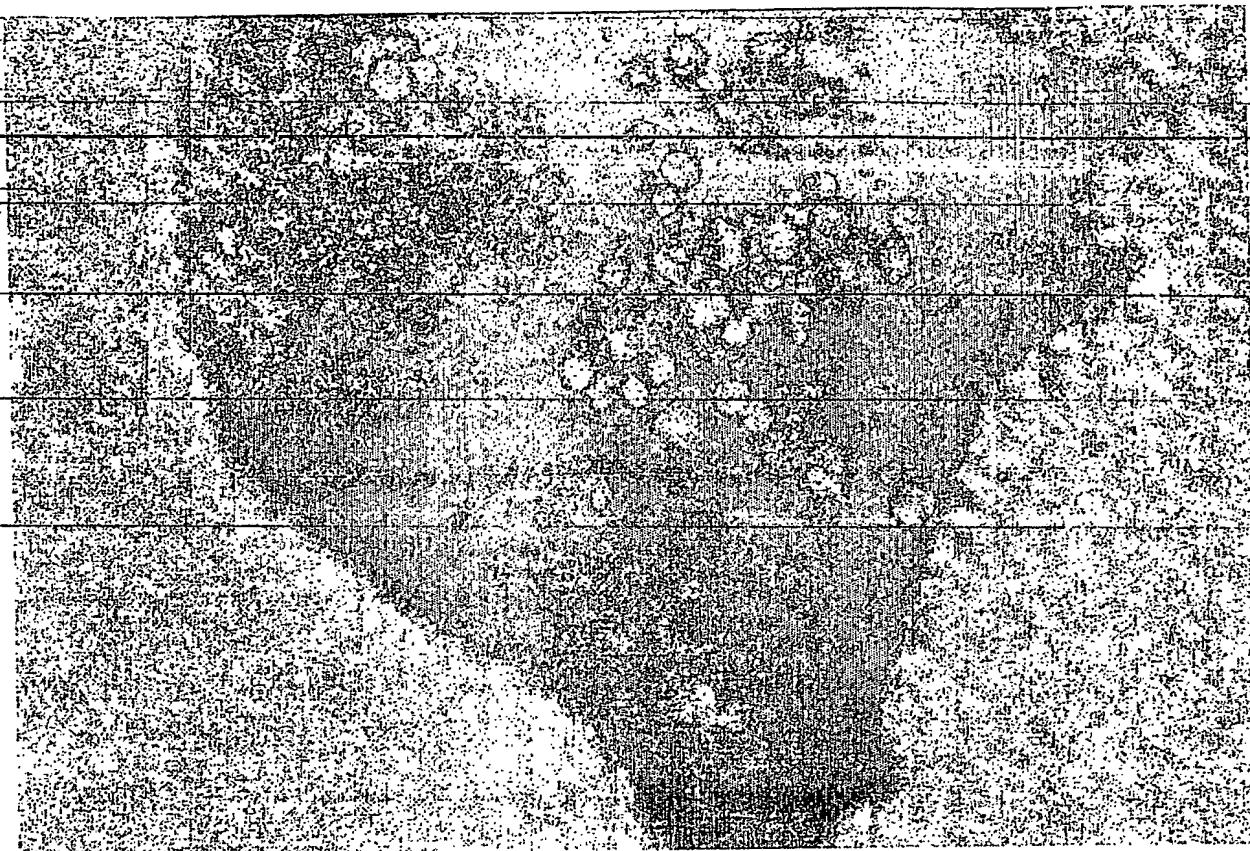


FIGURE 1

2 / 2

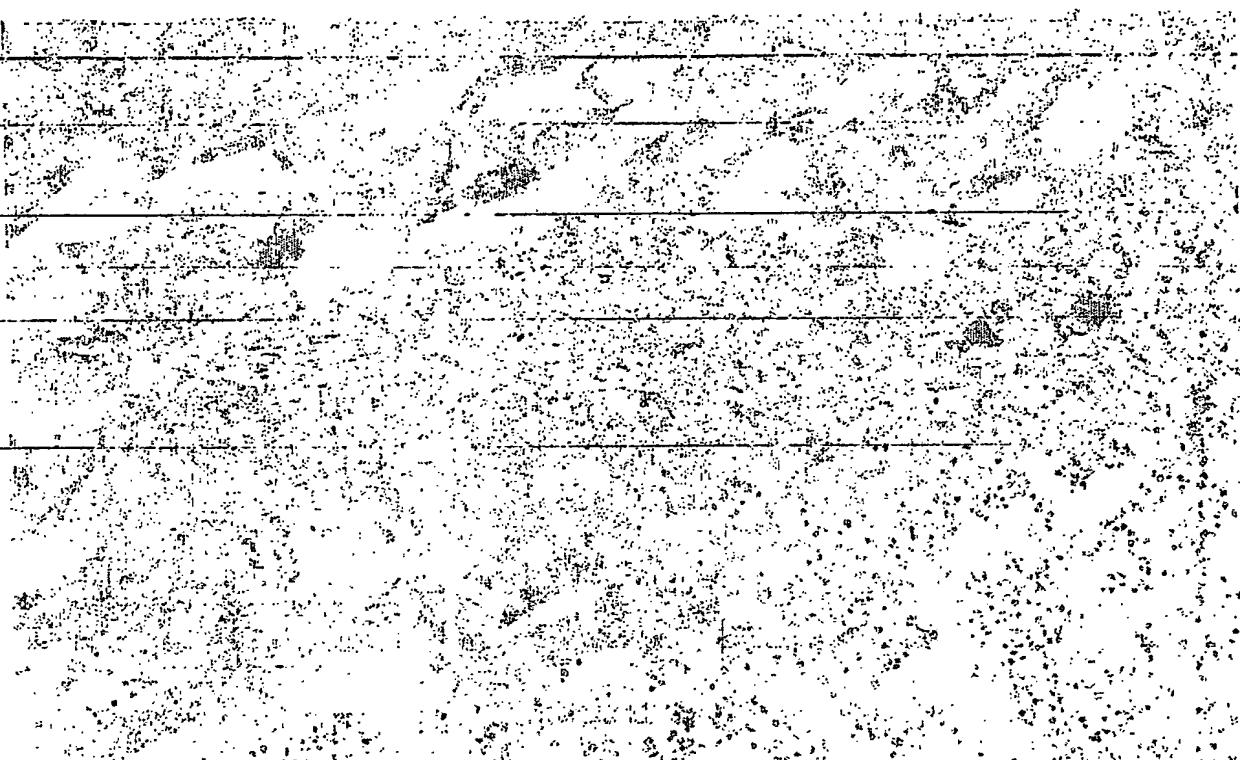
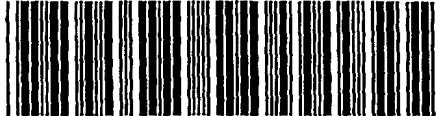


FIGURE 2

PCT/FR2003/003897



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.